

**(54) MANIFESTATION PROMOTER AND ITS USE**

- (11) 5-56781 (A) (43) 9.3.1993 (19) JP  
 (21) Appl. No. 2-405849 (22) 25.12.1993 (33) JP (31) 89p.334751 (32) 26.12.1989  
 (71) TAKEDA CHEM IND LTD (72) AKIYOSHI TANI(3)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup> C12N15/11, C12N5/10, C12N15/85//A61K48/00

**PURPOSE:** To provide a new recombinant DNA useful for allowing a cerebral nerve system cell to specifically produce various proteins.

**CONSTITUTION:** The objective recombinant DNA contains a promoter region of protein phosphorus-oxidase C gene, e.g. a recombinant DNA containing the promoter region having the base sequence of formula. It can be produced by cloning the promoter of rat PKC- $\gamma$  gene, integrating into an integration vector and inserting an arbitrary structural gene to the downstream of the gene.

GGTGT GGGAGCCAG ATAACAGACT GGAATGTATT TGGGAGAAAG  
 GGGGTGGACA AGGCTGGAG GAGTGGCTT GCTTGGATAG AGGCTGGAGA  
 ATGGGAGTGT GCACTGGAG AGGAGGAGG GCAACTGTC GGGGATCTT  
 GGGGCTGGGG GAGGCTGTTT AAAGTGAAG CCGGCTGTTT GGTGCTCATG  
 GCAAGGCTTA CCGGCTGCTT GCACTTCTAC ATTTCAGAG GTGCGGATAG  
 CCGAGCTCC CCGGCTGCTT GTGCTGCTG CT

**(54) GENE MANIFESTATION CONTROLLING DNA**

- (11) 5-56782 (A) (43) 9.3.1993 (19) JP  
 (21) Appl. No. 3-221885 (22) 2.9.1991  
 (71) KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD (72) RYOICHI KATSUMATA(1)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup> C12N15/11, C12N1/21, C12N9/10, C12N9/38, C12N9/88, C12N15/17,  
 C12N15/20, C12N15/27, C12N15/54, C12N15/56, C12N15/58, C12N15/60,  
 C12N15/67, C12N15/77, C12P21/02//C12N1/21, C12R1/15, C12N1/21,  
 C12R1/13, C12N1/21, C12R1/01, C12N9/10, C12R1/15, C12N9/10,  
 C12R1/13, C12N9/10, C12R1/01, C12N9/38, C12R1/15, C12N9/38,  
 C12R1/13, C12N9/38, C12R1/01, C12N9/88, C12R1/15, C12N9/88,  
 C12R1/13, C12N9/88, C12R1/01, C12P21/02, C12R1/15, C12P21/02,  
 C12R1/13, C12P21/02, C12R1/01

**PURPOSE:** To provide a new DNA having an action to control the manifestation of structural gene.

**CONSTITUTION:** A DNA originated from isocitrate lyase (ICL) gene of coryneform group of bacteria. It is integrated into a vector DNA together with a structural gene coding a protein and has an action to control the manifestation of the structural gene when introduced into a host coryneform group of bacteria. For example, a DNA included in the base sequence from the 1st to the 102nd bases of the base sequence of formula. It can be produced by extracting chromosome DNA from a coryneform group bacteria capable of producing glutamic acid, integrating the DNA into a plasmid, etc., transforming a microorganism with the recombinant DNA and separating the clone holding the recombinant DNA containing the objective DNA fragment.

**(54) NON-A NON-B HEPATITIS-RELATING NUCLEIC ACID, ANTIGEN, ANTIBODY AND THEIR DETECTION SYSTEM**

- (11) 5-56784 (A) (43) 9.3.1993 (19) JP  
 (21) Appl. No. 3-104010 (22) 8.2.1991 (33) JP (31) 90p.28191 (32) 9.2.1990(2)  
 (71) TETSUO NAKAMURA (72) TOSHIHARU MISHIRO(1)  
 (51) Int. Cl.<sup>5</sup> C12N15/51, C07K7/08, C07K7/10, C07K13/00, C12N15/06, C12P21/02,  
 C12P21/08, C12Q1/68, C12Q1/70, G01N33/576, G01N33/577//A61K39/00,  
 A61K39/29, A61K39/395(C12P21/02, C12R1/19), C07K99/00

**PURPOSE:** To provide a new DNA necessary for the diagnosis of non-A non-B hepatitis.

**CONSTITUTION:** The GORgab DNA having the base sequence of formula. Nucleic acid is extracted from the plasma of chimpanzee, a cDNA is synthesized with a cDNA synthesis kit according to Gubler method, a cDNA library is prepared by using  $\lambda$  gtlI cloning kit and the cDNA is screened by a double antibody method (the 1st antibody is a mixture of plasma of chimpanzee infected with non-A non-B hepatitis, human plasma and plasma of patient of non-A non-B chronic hepatitis; the 2nd antibody is anti-human IgG labeled with a peroxidase). An insert DNA is incised from the obtained GOR 47-1 phage DNA. GOR 47-1 RNA and GOR 47-1 RNAC are prepared from the phage script recombinant using T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> promoter. The products are labeled with a radioactive isotope to obtain a probe; which is used in the preparation of plural cDNA clones having overlaps with GOR 47-1 from the cDNA library. The clones are linked with each other to obtain the objective GORgab DNA.

GAATTCCTT TGGGAGAAAG GGGGTGGACA AGGCTGGAG GAGTGGCTT GCTTGGATAG AGGCTGGAGA  
 ATGGGAGTGT GCACTGGAG AGGAGGAGG GCAACTGTC GGGGATCTT  
 GGGGCTGGGG GAGGCTGTTT AAAGTGAAG CCGGCTGTTT GGTGCTCATG  
 GCAAGGCTTA CCGGCTGCTT GCACTTCTAC ATTTCAGAG GTGCGGATAG  
 CCGAGCTCC CCGGCTGCTT GTGCTGCTG CT

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-56782

(43)公開日 平成5年(1993)3月9日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/11	Z N A	7236-4B		
1/21		7823-4B		
9/10		7823-4B		
9/38		8828-4B		
			C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求	請求項の数11(全 23 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-221885

(22)出願日 平成3年(1991)9月2日

(71)出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 勝亦 瞭一

東京都町田市山崎町1380

(72)発明者 高野 裕

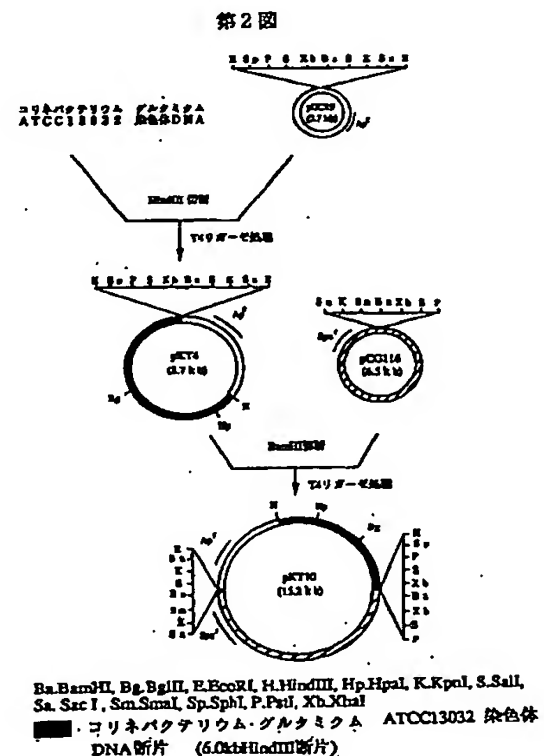
東京都町田市成瀬2-10-2

(54)【発明の名称】 遺伝子発現調節DNA

(57)【要約】

【目的】 遺伝子発現調節DNAおよびそれを用いたタンパク質の製造法を提供する。

【構成】 コリネ型細菌のイソクエン酸リアーゼ (ICL) 遺伝子に由来するDNAであって、タンパク質をコードする構造遺伝子とともにベクターDNAに組み込まれ、宿主コリネ型細菌に導入されたときに、該構造遺伝子の発現を調節する作用を有するDNAおよびそれを用いて有用タンパク質を効率よく製造する方法。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌のイソクエン酸リアーゼ（ICL）遺伝子に由来するDNAであって、タンパク質をコードする構造遺伝子とともにベクターDNAに組み込まれ、宿主コリネ型細菌に導入されたときに、該構造遺伝子の発現を調節する作用を有するDNA。

【請求項2】 構造遺伝子の発現が、培地中の炭素源を糖質にしたときに抑制され、培地中の炭素源を非糖質にしたときまたは糖質非存在培地で誘導されるものである請求項1記載のDNA。

【請求項3】 配列番号3に示される塩基配列の第1番から第702番までの塩基配列に包含されるDNAである請求項1記載のDNA。

【請求項4】 構造遺伝子が、ICL、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、インシュリン、成長ホルモン、インターフェロンおよび顆粒球コロニー刺激ホルモンから選ばれる酵素またはタンパク質をコードする遺伝子である請求項1記載のDNA。

【請求項5】 ICL遺伝子を採取するコリネ型細菌が、コリネバクテリウム属、プレビバクテリウム属およびミクロバクテリウム属から選ばれるものである請求項1記載のDNA。

【請求項6】 コリネ型細菌が、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラムATCC13870、コリネバクテリウム・アセトグルタミクムATCC15806、コリネバクテリウム・カルナエATCC15991、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868、コリネバクテリウム・メラセコーラATCC17965、コリネバクテリウム・リリウムATCC15990、プレビバクテリウム・イマリオフィラムATCC14068、プレビバクテリウム・サッカロリティクムATCC14066、プレビバクテリウム・チオゲニタリスATCC19240、プレビバクテリウム・ディバリカツムATCC14020、プレビバクテリウム・フラブムATCC14067、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869、プレビバクテリウム・ロゼウムATCC13825 および、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラムATCC15354 から選ばれる請求項5記載のDNA。

【請求項7】 宿主コリネ型細菌が、コリネバクテリウム属、プレビバクテリウム属およびミクロバクテリウム属から選ばれるものである請求項1記載のDNA。

【請求項8】 宿主コリネ型細菌が、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラムATCC13870、コリネバクテリウム・アセトグルタミクムATCC15806、コリネバクテリウム・カルナエATCC15991、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868、コリネバクテリウム・メラセコーラATCC17965、コリネバクテリウム・リリウムATCC15990、プレビバクテリウム・イマリオフィラムATCC14068、プレ

ビバクテリウム・サッカロリティクムATCC14066、プレビバクテリウム・チオゲニタリスATCC19240、プレビバクテリウム・ディバリカツムATCC14020、プレビバクテリウム・フラブムATCC14067、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869、プレビバクテリウム・ロゼウムATCC13825 および、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラムATCC15354 から選ばれる請求項7記載のDNA。

10 【請求項9】 コリネ型細菌のイソクエン酸リアーゼ（ICL）遺伝子に由来するDNAであって、タンパク質をコードする構造遺伝子とともにベクターDNAに組み込まれて宿主コリネ型細菌に導入されたときに、該構造遺伝子の発現を調節する作用を有するDNAとタンパク質をコードする構造遺伝子とがベクターDNAに組み込まれた組換えDNA。

20 【請求項10】 コリネ型細菌のイソクエン酸リアーゼ（ICL）遺伝子に由来するDNAであって、タンパク質をコードする構造遺伝子とともにベクターDNAに組み込まれて宿主コリネ型細菌に導入されたときに、該構造遺伝子の発現を調節する作用を有するDNAとタンパク質をコードする構造遺伝子とがベクターDNAに組み込まれた組換えDNAを含む形質転換体。

30 【請求項11】 コリネ型細菌のイソクエン酸リアーゼ（ICL）遺伝子に由来するDNAであって、タンパク質をコードする構造遺伝子とともにベクターDNAに組み込まれて宿主コリネ型細菌に導入されたときに、該構造遺伝子の発現を調節する作用を有するDNAとタンパク質をコードする構造遺伝子とがベクターDNAに組み込まれた組換えDNAを含む形質転換体を培地に培養し、培養物中に該タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該タンパク質を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はコリネ型グルタミン酸生産菌に由来するDNAであって、構造遺伝子の発現を調節する作用を有する新規DNAおよびそれを利用して有用蛋白質を効率よく生産する方法に関する。

## 【0002】

40 【従来の技術】 組換えDNA技術が発展し、異種生物の作る有用なポリペプチドを各種微生物に生産させることが可能となっている。しかし、外来遺伝子にもとづいて生産される遺伝子産物が宿主にとって有害である場合、宿主の増殖初期から該外来遺伝子を発現させると宿主は死滅あるいは増殖阻害を受け、該遺伝子産物を多量に作らせることが困難である。このような不都合を回避するためには、宿主微生物の増殖が終了した後に、外来遺伝子の発現を誘導する発現系が必要となる。宿主として最もよく使われている大腸菌では、特定の化合物あるいは物理的条件に应答して作動するプロモーターを利用した

遺伝子の誘導発現系 [Goeddel, D., et. al., プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) U.S.A., 76, 106 (1979), Edman, J. C., et. al., ネイチャー (Nature), 291, 503 (1981), Shimatake, H., et. al., ネイチャー (Nature), 292, 128 (1981)] が確立されており、この系を用いて多岐にわたる有用蛋白質が生産されている。

【0003】一方、組換えDNA技術は各種のアミノ酸およびプリンヌクレオチド等の発酵生産に使用されているコリネ型細菌にも適用可能であり、工業的に実績のあるこれらの菌種で有用蛋白質を生産させるための検討が行われている。これまでに、コリネ型グルタミン酸生産菌で機能するプロモーター検出用ベクターを用いて、レポーター遺伝子を構成的に発現させる該菌種のプロモーターが得られている (特開昭63-273469) が、発現を制御できるプロモーターについては知られていない。コリネ型細菌で人為的に外来遺伝子の発現を調節する方法については、前述した大腸菌において外来遺伝子の発現を誘導できる大腸菌のプロモーターをそのままコリネ型グルタミン酸生産菌に適用し、該菌種でクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を誘導発現させた例がある (特開昭62-151184)。しかし、この発現方法は、大腸菌を宿主とした場合に比べて遺伝子産物の蓄積量が少なく十分に強力な発現方法とは言い難い。

#### 【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って、コリネ型細菌において有用遺伝子産物を効率よく生産させるためには、該宿主で機能し人為的に構造遺伝子の発現を調節できる作用を有するDNAを取得する必要がある。

#### 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、コリネ型グルタミン酸生産菌において培地などの環境条件によって発現が調節される遺伝子を鋭意検索した結果、該菌種の有するインクエン酸リアーゼ (以下ICLと表す) 遺\*

コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC13032
コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム	ATCC13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミクム	ATCC15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC15991
コリネバクテリウム・ハーキュリス	ATCC13868
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC17965
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC15990
プレバクテリウム・イマリオフィラム	ATCC14068
プレバクテリウム・サッカロリテイクム	ATCC14066
プレバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC19240
プレバクテリウム・ディバリカツム	ATCC14020
プレバクテリウム・フラブム	ATCC14067
プレバクテリウム・ラクトファーメンタム	ATCC13869
プレバクテリウム・ロゼウム	ATCC13825
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム	ATCC15354

【0009】コリネ型グルタミン酸生産菌からの染色体 DNAの抽出は、例えば特開昭58-126789に記載の方

\* 伝子の発現が、培地中の炭素源をグルコース、シュクロース、マルトース等の糖質にしたときに抑制され、培地中の炭素源を酢酸、乳酸、エタノール等の非糖質にしたときまたは糖質非存在培地で誘導され、その発現レベルが極めて高いことを見出した。この遺伝子に着目してICL遺伝子をコードするDNA断片をクローン化し、該遺伝子の発現を調節する作用を有するDNAの塩基配列を決定したところ、該DNAは新規なDNAであることおよびこれを用いて所望の遺伝子をコリネ型細菌で効率よく発現させることができることを見出し、これに基づいて本発明を完成するに至った。

【0006】以下、本発明を詳細に説明する。本発明は、コリネ型細菌のICL遺伝子に由来するDNAであって、タンパク質をコードする構造遺伝子とともにベクターDNAに組み込まれ、宿主コリネ型細菌に導入されたときに、該構造遺伝子の発現を調節する作用を有するDNA (以下、ICLプロモーターと表す)、および該ICLプロモーターとタンパク質をコードする構造遺伝子とがベクターDNAに組み込まれた組換えDNAを含む形質転換体を培地に培養し、培養物中に該タンパク質を生成蓄積させ、該培養物から該タンパク質を採取することを特徴とするタンパク質の製造法に関する。

【0007】上記のICLプロモーターは、構造遺伝子の発現が培地中の炭素源を糖質にしたときに抑制され、培地中の炭素源を非糖質にしたときまたは糖質非存在培地で誘導されるという発現制御特性を有している。本発明のICLプロモーターおよびICL構造遺伝子を含むDNAは、コリネ型細菌のうちグルタミン酸生産性を有し、分類学上近縁性の高いいわゆるコリネ型グルタミン酸生産菌から分離採取することができる。コリネ型グルタミン酸生産菌であればいずれも使用できるが、好適には下記の菌株が用いられる。

#### 【0008】

法、あるいはこれに準じた方法によって行われる。この染色体DNAからICL遺伝子領域を含むDNA断片を単離するには、適当な制限酵素で処理した染色体DNAを、同じ制限酵素あるいは同じ接着末端を生じさせる制限酵素で処理したプラスミドあるいはファージDNAに組み込んだ後、該組換えDNAで微生物を形質転換し、目的のDNA断片を含む組換えDNAを含有するクローンを分離することによって達成される。

【0010】例えば、形質転換宿主として大腸菌を、ベクターとしてプラスミドを使用する場合には、コロニーハイブリダイゼーション [Hanahan, D. et. al., ジーン(Gene), 10, 63(1980)] を用い、ICLのアミノ酸配列の一部をコードする合成DNAと対合するDNA断片を含有する形質転換体を検出することによって、ICL遺伝子を含むDNA断片をプラスミドベクター上に有するクローンを分離することができる。プローブとして使う合成DNAは、例えばICLを分離後、N末端部分のアミノ酸配列を決定し、その配列に対応するポリヌクレオチドを公知の方法 [M. H. Caruther et. al., ケミカル・シンセシス・オブ・タイトル・ジーン・フラグメンツ (Chemical Synthesis of Gene Fragments) a Laboratory manual, Verlag, Chemie(1982)] で化学合成したものを用いればよい。この大腸菌でのクローン化に要する一連の基本操作は公知であり、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)(1982) コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory) 編著に詳しく記載されている。

【0011】上記の方法で得られたクローン化断片が、ICLプロモーターおよびICLをコードする構造遺伝子を保持するかどうかは、コリネ型グルタミン酸生産菌に導入することによって確認することができる。そのために、クローン化断片を挿入した上記大腸菌プラスミドにコリネ型グルタミン酸生産菌で自律複製できるベクターを連結するか、あるいはクローン化断片を該コリネ型グルタミン酸生産菌用ベクターに組み込んだ組換えDNAを作成する。これらの組換えDNAは、invitroで組換えた後、コリネ型グルタミン酸生産菌を形質転換し、目的の構造を有するプラスミドを含有する形質転換体を得ることによって調製できる。なお、コリネ型グルタミン酸生産菌用ベクターとしては、該菌種において自律複製能を有するものであればいかなるものでもよく、例えばpCG1(特開昭57-134500)、pCG2(特開昭58-35197)、pCG4(特開昭57-183799)、pAM330(特開昭58-67699)、pAG1、pAG3、pAG14、pAG50(特開昭62-166890)あるいはそれらから誘導されるプラスミドが使用可能である。コリネ型グルタミン酸生産菌からプラスミドを調製するには、例えば特開昭57-134500に記載された方法が用いられる。また、コリネ型グルタミン酸生産菌の形質転換は、プロトプラストを使用する方法(例えば特開昭57-1864

92)あるいはエレクトロポレーション法[アプライド・マイクロバイオロジー・アンド・バイオテクノロジー(Appl. Microbiol. Biotechnol.), 30, 283(1989)]によって行われる。

【0012】上記で調製した組換えDNAでコリネ型グルタミン酸生産菌のICL活性欠損変異株を形質転換し、該形質転換株がICL合成能を獲得していれば、クローン化断片上にICL遺伝子が存在することを確認することができる。ICL活性を保有する野生株を形質転換した場合にも、形質転換体が酢酸、乳酸、エタノール等の非糖質を培地中の炭素源として培養したとき、または糖質非存在培地で培養したときに宿主自体より高レベルのICL活性を発現することを指標にしてICL遺伝子の存在が確認される。これらの形質転換体からプラスミドを抽出し、制限酵素で切断後、アガロースゲル電気泳動によって挿入されたICL遺伝子を含むDNA断片を単離することができる。

【0013】このICL遺伝子含有DNA断片をサブクローン化し、各種の縮小化断片を含む欠失プラスミドのICL活性付与能あるいは増幅能を調べることによりICL遺伝子の存在をさらに限定することができる。ICL遺伝子を含むDNA断片塩基配列はジデオキシヌクレオチド合成鎖停止法[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.), 94, 441(1975)]あるいはマキシム・ギルバート法[プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.), 74, 560(1977)]などの方法を用いて決定できる。DNA塩基配列上でICLのN末端アミノ酸配列をコードする塩基配列を見出すことによって、解読されるオープンリーディングフレームが推定される。オープンリーディングフレームの存在に基づき、ICLプロモーター活性を含む領域はそのオープンリーディングフレームの上流に存在していることがわかる。

【0014】このような解析によって、例えば実施例に示したコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032の場合、該菌株のICLプロモーター活性は配列番号3に示すDNA塩基配列のうち、第1番目から第513番目までの配列に含まれていると特定することができる。本発明のICLプロモーター活性は、このDNA配列に限定されず、プロモーター活性を損なわない範囲で一部を削除あるいは改変しても構わない。

【0015】ICLプロモーター活性を有するDNA断片の下流に、各種構造遺伝子さらに転写を終止させるターミネーターを配したDNAを前述のコリネ型グルタミン酸生産菌で自律複製できるプラスミドに組み込むことにより、発現ベクターが得られる。ターミネーターとしては、ICL遺伝子のターミネーターが好ましいが、コリネ型グルタミン酸生産菌の他の遺伝子のターミネーターあるいは大腸菌および枯草菌遺伝子由来の $\rho$ -因子非依存性のターミネーター[アニュアル・レビュー・オブ

・ジェネティクス(Ann. Rev. Genet.), 13, 319(1979)も使用できる。構造遺伝子としては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ICLなどの酵素類、あるいはインシュリン、成長ホルモン、 $\alpha$ -,  $\beta$ -または $\gamma$ -インターフェロン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)などの生理活性蛋白質が挙げられる。

【0016】上記の発現ベクターで宿主を形質転換し、該形質転換体を培養することによって、目的とする遺伝子産物を取得することができる。宿主としては、前記のコリネ型グルタミン酸生産菌が好ましいが、その他のコリネ型細菌も使用することができる。培地中の炭素源として酢酸、乳酸などの非糖質を用い、その他に窒素源、無機物、ビタミンなどを含有する培地で形質転換体を培養することによって、目的の遺伝子産物を培地中に蓄積させることができる。あるいは形質転換体をグルコース、シュークロース、マルトースなどの糖質を炭素源として含む培地でまず増殖させ、糖質が消費されたところで、上記の非糖質炭素源を添加または糖質非存在培地を用いて、さらに培養を継続しても遺伝子産物を取得することができる。

【0017】培養は通気あるいは攪拌しながら好気的条件下で行う。通常、培養中、培地のpHを中性付近に維持することが好ましい。培養温度、時間などの条件は宿主微生物の増殖および形質転換体の遺伝子産物の産生が最高になるように設定されるが、一般に温度は15~40℃、時間は4~72時間が好適である。培養物中に蓄積された遺伝子産物は、公知の方法、例えば機械的破砕法、あるいは溶菌酵素を用いる方法などによって、菌体を破砕して抽出される。抽出液から目的の遺伝子産物を分離精製するには、通常用いられる蛋白質の精製方法、例えば沈澱剤による沈澱法、透析法、電気泳動法、イオン交換樹脂などによるクロマトグラフ法、ゲル濾過法、抗体カラムを用いる方法などを組み合わせて行うことができる。

【0018】以下に、実施例を挙げて更に具体的に本発明を説明する。

#### 【0019】

##### 【実施例】

実施例1 コリネ型グルタミン酸生産菌のICL遺伝子の発現様式

コリネ型グルタミン酸生産菌であるコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラムATCC13870、コリネバクテリウム・カルナエATCC15991、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868、コリネバクテリウム・リリウムATCC15990、プレビバクテリウム・イマリオフィラムATCC14068、プレビバクテリウム・ディバリカツムATCC14020、プレビバクテリウム・フラブムATCC14067、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13655 およびミク

ロバクテリウム・アンモニアフィラムATCC15354 各一白金耳をNB培地(粉末ブイヨン20g、酵母エキス5g、グルコース10gを水1リットルに含みpH7.2に調整した培地)に植菌し、30℃で16時間振とう培養し増殖させた。この種培養液0.8mlを、酢酸を炭素源とする半合成培地MAYE培地[酢酸アンモニウム20g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10g、尿素3g、酵母エキス1g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2mg、ビオチン60 $\mu\text{g}$ 、サイアミン塩酸塩2mg、NaCl 50mgを水1リットルに含みpH7.2に調整した培地]およびシュークロースを炭素源とするMSYE培地[シュークロース20g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10g、尿素3g、酵母エキス1g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2mg、ビオチン60 $\mu\text{g}$ 、サイアミン塩酸塩2mg、NaCl 20mgを水1リットルに含みpH7.2に調整した培地]にそれぞれ接種し、30℃にて16時間培養した。

【0020】菌体を集菌し、100mMリン酸緩衝液(pH7.0)で2回洗浄後、同緩衝液5mlに懸濁した。菌液を氷冷しながら超音波破砕器(TOMY社製ペンシル型ソニック)で15分間破砕処理した。処理液を4℃にて10分間遠心(14000 $\times g$ )し、上清を細胞抽出液として回収した。

【0021】この細胞抽出液中のICL活性を、イソクエン酸を基質として生成するグリオキシル酸を定量する方法[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.), 64, 355(1968)]によって測定した。予め30℃に保温した反応液(Tris-HCl 0.14M(pH7.5)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20mM、グルタチオン20mM) 2.0mlに、蛋白量30 $\mu\text{g}$ に相当する細胞抽出液と20 $\mu\text{l}$ の0.4Mイソクエン酸溶液を加えて反応を開始し、30℃で10分間反応させた。反応液に1mlの0.5Mシュウ酸溶液を加えて反応を停止させた。さらに0.5mlの1%フェニルヒドラジン溶液を加えて70℃、10分間加熱後、氷水中で5分間冷却した。次いで、2mlの濃塩酸と0.5mlの0.5%フェリシアン化カリウム溶液を加えて発色させ、日立比色計(モデル100-20)で520nmの吸光度を測定した。1分間に1 $\mu\text{mol}$ のグリオキシル酸の生成を触媒する酵素活性を1単位(U)とし、蛋白質1mg当りの比活性を算出し、その結果を表1に示した。蛋白量は、プロテイン・アッセイキット(バイオラッド社製)を用いて定量した。

【0022】その結果、いずれの菌株においても、MSYE培地で培養した菌体にはICL活性は微弱かあるいは検出されなかったが、MAYE培地で培養した菌体には高レベルのICL活性が認められた。グルコース、マルトース、グルコン酸などの糖質を炭素源とした培地で培養した場合にも、シュークロース含有培地の場合と同様にICL活性は微弱かあるいは検出されなかった。炭素源として乳酸、エタノール、ビルビン酸などの非糖質



を含む培地で培養した時には、酢酸含有培地の場合と同レベルのICL活性が検出された。

【0023】以上の結果から、試験に用いた全てのコリネ型グルタミン酸生産菌のICL遺伝子は培地中、糖質を炭素源として培養したときには発現抑制され、非糖質炭素源で培養したときに誘導発現されることが判明した。上記の各種細胞抽出液をラムリィの方法〔ネイチャー(Nature), 227, 680(1970)〕によるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で解析した。15 $\mu$ g相当の蛋白質を含む細胞抽出液を10%アクリルアミドゲルに載せ、電気泳動後、ゲルを染色液(クマシーブルーR250 0.1%、メタノール50%)で染色し、次いで脱色液(メタノール40%、酢酸10%)で脱色して、染色された蛋白質を観察した。

【0024】その結果、上記グルタミン酸生産菌中一例を除いた全ての菌株において、MAYE培地で培養した菌体中には、約48キログルトン(kDa)の大きさを有するICL蛋白質が著量存在することが確認された。一方、コリネバクテリウム・カルナエATCC15991についてもMAYE培地で培養した菌体中にもICL蛋白質の著量生成が認められたが、その蛋白質のサイズは約52kDaであった。しかし、いずれの菌株の場合も、MSYE培地で培養した菌体中には48kDaあるいは52kDaのICL蛋白質は殆ど存在していなかった。

【0025】さらに、生成した48kDaあるいは52kDaのICL蛋白質の全菌体蛋白質に占める割合を求めるために、一次元のデンストメーター(島津製作所社製 model UV265)を用いて染色ゲルを一方に走査し、色素濃度の分布を可視吸収(560nm)の度合いで測定した。その結果、MAYE培地で培養した菌体中に、48kDaあるいは52kDaのICL蛋白質が全菌体蛋白質の5~10%相当量占めることが分かった。なお、MSYE培地で培養した菌体中にはこれらの蛋白質の存在は殆ど検出されなかった。

【0026】また、上記の各種細胞抽出液をコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032のICL蛋白質に対する抗体を用いたウエスタン・ブロット法〔Towbin, H., プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) U.S.A., 76, 4350(1979)〕による解析を行った。上記で調製した各種コリネ型グルタミン酸生産菌の細胞抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲルに載せ、泳動を行った後、ゲルの上にブロッティング緩衝液〔25mM Tris-HCl, 192mM グリシン(pH8.3)〕に浸したメンブランフィルター(クリアブロットP膜、アトー社製)を置いた。これをブロッティング緩衝液に浸した濾紙(ワットマン社製 3MM)ではさんで、転写装置(アトー社製)にセットし、180mA定電流で1時間転写を行った。転写後、フィルターを1%BSA(牛血清アルブミン)を含むTBS緩衝液〔20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl(pH7.5)〕に浸し

室温で1時間置いた。

【0027】一方、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032をMAYE培地で生育させた菌体の細胞抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲルに載せ泳動を行った後、ゲルから48kDa蛋白質に相当する位置を切り取り、0.05%Tween20を含むTBS緩衝液に懸濁した。この懸濁液の上清を分取し、マウスに注射してポリクローナル抗体(48kDa蛋白質抗体)を作製した。

【0028】上記の転写処理したフィルターを48kDa蛋白質抗体および1%BSAを含むTBS緩衝液に浸し、4℃に一晩置いた。さらに、フィルターを0.05%Tween20を含むTBS緩衝液で3回洗った後、抗マウスIgG-ペルオキシダーゼ(ダコ社製)および1%BSAを含むTBS緩衝液に室温で振とうしながら浸した。1時間後、フィルターを0.05%Tween20を含むTBS緩衝液で洗浄した。このフィルターを4-クロロ-1-ナフトール(パイオラッド社製)60mgを溶かした20mlのメタノールと、60 $\mu$ lの過酸化水素水を含む100mlのTBS緩衝液とを混ぜた液に浸し発色反応を行った。48kDa蛋白質抗体は、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032だけでなく、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラムATCC13870、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868、コリネバクテリウム・リリウムATCC15990、プレバクテリウム・イマリオフィラムATCC14068、プレバクテリウム・ディバリカツムATCC14020、プレバクテリウム・フラブムATCC14067、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13655、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラムATCC15354の48kDaのICL蛋白質およびコリネバクテリウム・カルナエATCC15991の52kDaのICL蛋白質と反応した。このことから、これら蛋白質が同一あるいは極めて類似性のあることがわかった。

【0029】実施例2 コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032のICL遺伝子のクローニング

(1) ICL蛋白質のN末端アミノ酸配列の決定  
コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032の細胞抽出液には、48kDa付近にその他の蛋白質が殆ど検出されないため、SDS-PAGEで48kDaのICL蛋白質を分離後、N末端アミノ酸配列を決定した。

【0030】実施例1と同様に、MAYE培地で培養したコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032の菌体抽出液を調製し、その3 $\mu$ lをSDS-PAGEにかけた。泳動後、ゲルを転写用緩衝液〔10mM3-シクロヘキシルアミノ-1-プロパンスルホン酸、10%メタノール(pH11.0)〕に室温で5分間浸した。トービンらの方法〔プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) U.S.A., 76, 4530(1979)〕に従ってゲルの蛋白質を予めメタノールに浸したPVDF膜(Millipore社製、0.45 $\mu$ mポアサイズ)に転写した。PVDF膜を脱イオン水で5分間洗浄後、クマ

シー染色液 (0.1% クマシーブルー R250、50% メタノール) 中で5分間染色し、次いで脱色液 (40% メタノール、10% 酢酸) に5分間浸して脱色した。さらに、PVDF膜を脱イオン水に5分間浸して洗浄した後、風乾した。この膜上で染色された48kDaのICL蛋白を切り出し、マツダイラらの方法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 262, 10035 (1987)] に従い、N末端アミノ酸配列の決定を行った。

【0031】すなわち、膜上に転写されたICL蛋白質を用いてプロテインシーケンサー (アプライド・バイオシステム社製 model 470) によるエドマン分解を行い、該蛋白質のN末端アミノ酸配列を分析した結果、配列番号1で表されるアミノ酸配列が同定された。

【0032】(2) オリゴヌクレオチドプローブの合成  
上記で決定したアミノ酸配列に対応する塩基配列 (配列番号2) を有するオリゴヌクレオチドを、アプライド・バイオシステム社製オリゴヌクレオチド合成機 (Model 380A) を用いたホスホラミダイト法 [M. H. Caruthers et al. ケミカル・シンセシス・オブ・タイトル・ジーン・フラグメンツ (Chemical Synthesis of Gene Fragments), a Laboratory manual, Verlag, Chemie (1982)] により合成した。

【0033】この50mer オリゴヌクレオチドプローブを [ $\gamma^{32}$ ] ATP (アマシャム3000Ci/mmol) を用いて5'-ラベル化した。0.2  $\mu$ g のプローブDNAを含む15  $\mu$ l のキナーゼ緩衝液 [50mM Tris-HCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、5mM DTT、0.1mM EDTA (pH 7.6)] に10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) を添加し、37℃で30分間反応させた。さらに、フェノール抽出した反応液をセファデックスG50を用いたゲル濾過に供し、5'末端がラベル化されたプローブを得た。

【0034】(3) コロニーハイブリダイゼーション法によるICL遺伝子含有断片のクローニング  
NB培地で培養したコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032 の種培養液0.8mlを40ml SSM培地 [グルコース20g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10g、尿素 3g、酵母エキス 1g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2mg、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 2mg、ピオチン60  $\mu$ g、サイアミン塩酸塩 2mg、NaCl 50mg を水 1リットルに含みpH7.2に調整した培地] に接種して30℃で振とう培養した。日立比色計 (model 100-20) で660nmにおける吸光度 (OD) を測定し、ODが0.2になった時点で培養液へ0.5単位/mlの濃度となるようにペニシリンGを添加した。さらに、培養を継続し、ODが0.6になるまで生育させた。培養液から菌体を集菌し、TES緩衝液 [0.03M Tris-HCl、0.005M EDTA、0.05M NaCl (pH8.0)] で洗浄後、リゾチーム液 [25% シュークロース、0.1M NaCl、0.05M Tris-HCl、0.8mg/ml リゾチーム (pH8.0)] 10mlに懸濁し、37℃で2時間保温した。集菌した菌体から

サイトウらの方法 [バイオケミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ (Biochem. Biophys. Acta.), 72, 619 (1963)] に従って高分子染色体DNAを単離した。一方、pUC19 (宝酒造社製) を保有するE. coli ATCC33694から常法に従ってビルボイムらの方法 [ヌクレック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids. Res.), 7, 1513 (1979)] によりpUC19を調製した。

【0035】コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032 の染色体DNA 5  $\mu$ g を含む緩衝液B [10mM Tris-HCl (pH7.5)、50mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT] 98  $\mu$ l に20単位のHind IIIを添加し、37℃で2時間反応させた。一方、pUC19プラスミドDNA 1  $\mu$ g を含む緩衝液B 48.5  $\mu$ l に5単位のHind IIIを添加し37℃で1時間反応させた。これら反応物を混合した後、フェノール抽出、エタノール沈澱を行ってDNAを回収した。このDNA全量をライゲーション緩衝液 [20mM Tris-HCl (pH7.6)、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、1mM ATP] 59  $\mu$ l に溶解し、さらに350単位のT4リガーゼを添加後、16℃で15時間反応させ連結処理した。

【0036】このDNA反応液を用いてダジェルトらの方法 [ジーン (Gene), 6, 23 (1979)] によりE. coli ATCC33694を形質転換した。アンピシリン100  $\mu$ g/mlを含有するLBプレート [1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl (pH7.4)] 上にニトロセルロースフィルター (Gelman Science 社製、Bio Trace<sup>TM</sup>NT) をかぶせ、その表面に形質転換細胞を塗布した。プレートを37℃にて16時間置いた後、フィルター上に形成されたコロニーを2枚のニトロセルロースフィルターにレプリカし、計3枚のフィルターをアンピシリン100  $\mu$ g/mlを含有するLBプレート上に移して37℃で6時間増殖させた。レプリカした2枚のニトロセルロースフィルターを、さらに250  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコールおよび100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するLBプレートに移し、37℃で16時間培養後、0.5M NaOH液、1.0M Tris-HCl (pH7.5) 液、1.5M NaCl-0.5M Tris-HCl (pH7.5) 液および2×SSC液 [0.3M NaCl、0.03M Na<sub>3</sub>-citrate (pH7.0)] を浸したワットマン 3MM 濾紙の上に逐次移してゆき、コロニーから露出したDNAを変性させた。さらに風乾後、80℃で3時間加熱して、フィルター上にDNAを固定させた。一方、残りの1枚のフィルターはプレートに乗せたまま4℃で保存した。

【0037】遺伝子ライブラリーが固定化されたレプリカフィルターを、3×SSC液 [0.45M NaCl、0.045M Na<sub>3</sub>-citrate (pH7.0)] 中で65℃で30分間浸した後、1×デンハルト液 (0.2% フィコール、0.2% ポリビニルピロリドン、0.2% BSA) 中に移して65℃で1時間置いた。フィルターをブレイブリダイゼーション緩衝液 [1×デンハルト液、1M NaCl、50mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA、0.1% SDS、100  $\mu$ g/ml 変性サケ精子DNA] が入ったポリプロピレン製の袋に入れ65℃で3時間前



処理した後、放射ラベルされた50mer オリゴヌクレオチドプローブ〔実施例2(2)〕0.2μgを加え、40℃で16時間ハイブリダイゼーション処理した。フィルターをいずれも6×SSC液〔0.9M NaCl、0.09M Na<sub>3</sub>-citrate、(pH7.0)〕中で、順次、4℃で5分間処理を2回、52℃で30分間処理を2回、4℃で5分間処理を2回ずつ行い洗浄した。フィルターを風乾後、X線フィルム(フジフィルム社製)に密着させ感光させた。

【0038】このようにして、約8500株のクローンの中からハイブリダイズするコロニーを1個見出した。さらに、このコロニーに対応する保存プレート上から単集落分離されたクローンについて再試験した結果、6.0キロボース(kb)のHindIII断片をpUC19のHindIII部位に挿入した構造を有していた。このプラスミドをpKT4と命名した。

【0039】実施例3 ICL遺伝子増幅株におけるICL遺伝子の発現

(1) コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032(pKT10)のICL遺伝子の発現

前記のクローン化断片上にICL遺伝子が含まれることを明らかにするために、pKT4をコリネ型細菌のベクターpCG116(特開平1-265892)に挿入した。pCG116は、pCG116を保有するコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032の培養菌体から次の方法で単離した。スペクチノマイシン100μg/mlを含有するNB培地で増殖させたpCG116を保有するコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032の種培養液8mlを、スペクチノマイシン100μg/mlを含有する400ml SSM培地に接種し、30℃にて振とう培養した。ODが0.2になった時点で、培養液へ0.5単位/mlの濃度となるようにペニシリンGを添加した。さらに、培養を継続し、ODが0.6になるまで生育させた。菌体を集菌しTES緩衝液で洗浄後、リゾチーム液10mlに懸濁し37℃で4時間反応させた。反応液に5M NaCl 2.4ml、0.5M EDTA (pH8.5) 0.6ml、4%ラウリル硫酸ナトリウムおよび0.7M NaClからなる溶液4.4mlを順次添加し、穏やかに混和してから氷水上に15分間置いた。溶菌物を遠心管に移し、4℃で60分間、69,400×gの遠心分離にかけ上清液を回収した。これに重量百分率10%相当のポリエチレングリコール(PEG 6000)を加え、静かに混和して溶解後氷水上に置いた。10時間後、1,500×gで10分間遠心分離してペレットを回収した。TES緩衝液5mlを加えてペレットを再溶解してから1.5mg/mlエチジウムブロマイド2.0mlを添加し、さらに塩化セシウム7.5gを加えて静かに溶解し密度を1580に合わせた。この溶液を105,000×g、18℃で48時間超遠心分離にかけ、紫外線照射下に検知される遠心チューブ下方の密度の高いバンドを遠心チューブ側面から注射器で抜き取ることによって、pCG116プラスミドDNAを分離した。この分画液を等容量のイソプロピルアルコール液(容量百

分率90%イソプロピルアルコール、10%TES緩衝液)で5回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後TES緩衝液に対して透析した。

【0040】pCG116プラスミドDNA 1μgを含む緩衝液C〔10mM Tris-HCl(pH7.5)、100mM NaCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT〕19μlに5単位のBamHIを添加し、37℃で1時間反応させた。一方、実施例2(3)で用いた方法によりE.coli ATCC33694形質転換体の培養菌体から単離したpKT4プラスミドDNA 1μgを含む緩衝液49μlに5単位のBamHIを添加し、37℃で1時間反応させた。これら両反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動で分離した後、DNA回収精製キット(旭硝子社製)を用いて各々6.5kbおよび8.7kbの断片として回収した。両DNA断片を、常法のリガーゼ処理により連結した。このリガーゼ反応液を用いて、実施例2(3)に従ってE.coli ATCC33694を形質転換し、スペクチノマイシン25μgを含むLBプレート上でスペクチノマイシン耐性形質転換体を分離した。該形質転換体のうち、1つの形質転換体から第2図に示すプラスミドpKT10を単離した。

【0041】pKT10DNA 1μgをコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032のプロトプラスト形質転換〔ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(J. Bacteriol.), 159, 306(1984)〕に供した。プロトプラストは、次のように調製した。NB培地で増殖させたATCC13032株の種培養液0.8mlを40ml SSM培地に接種して振とう培養した。ODが0.2になった時点で、培養液へ0.5単位/mlの濃度となるようペニシリンGを添加した。さらに、培養を継続し、ODが0.6になるまで生育させた。培養液から菌体を集菌し、10mlのRCGP培地〔グルコース5g、カザミノ酸5g、酵母エキス2.5g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.5g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5g、MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O 0.41g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 10mg、MnSO<sub>4</sub>・4~6H<sub>2</sub>O 2mg、ZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.9mg、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub>・4H<sub>2</sub>O 0.04mg、ビオチン30μg、サイアミン塩酸塩 2mg、コハク酸ナトリウム 135g、ポリビニルピロリドン(分子量10000) 30gを水1リットルに含みpHを7.4に調整した培地〕に1mg/mlのリゾチームを含む溶液(pH7.6)に懸濁した後、30℃で16時間静置してプロトプラスト化した。このプロトプラスト菌液を2,500×gで5分間遠心分離し、TSMC緩衝液〔10mM MgCl<sub>2</sub>、30mM CaCl<sub>2</sub>、50mM Tris-HCl、400mM シュクロース(pH7.5)〕1mlに懸濁して遠心洗浄後、TSMC緩衝液0.1mlに再懸濁した。この懸濁液に、上記に調製したpKT10プラスミドDNA液10μlを加えて混和し、次いでTSMC緩衝液中に20%PEG 6000を含む液0.8mlを添加して混和した。さらに、氷水中で20分間、37℃で3分間置いた後、2,500×gで5分間遠心分離にかけて上清液を除去した。沈澱したプロトプラストを1mlのRCGP培地に懸濁した後、この菌株0.2mlをスペクチノマイシン400μg/mlを含むRC

G Pプレートに塗布し、30℃で7日間の培養を行い形質転換体を得た。形質転換体に含有されるプラスミドを制限酵素切断解析した結果、形質転換体はpKT10を有することが確認された。

【0042】また、同様にして、公知の方法〔ジャーナル・オブ・ジェネラル・アプライド・ミクロバイオロジー(J. Appl. Microbiol.), 15, 27 (1969)]に従って、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032 から酢酸非資化性変異株として取得したICL欠損変異株を、pKT10プラスミドDNA液を用いて形質転換した。pKT10の導入された該ICL欠損変異株は、酢酸を炭素源とするMA培地〔酢酸アンモニウム20g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10g、尿素 3g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.4g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 2mg、MnSO<sub>4</sub>・4H<sub>2</sub>O 2mg、ビオチン 60 μg、サイアミン塩酸塩 2mg、NaCl 50 mgを水1リットルに含みpH7.2に調整した培地〕での増殖能を獲得し、ATCC13032(pKT10)株と同レベルのICL活性を有していた。このことから、pKT10上に存在するコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032 由来の6.0kb HindIII DNA断片は、ICL遺伝子を含むことが確認された。

【0043】コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032 およびATCC13032(pKT10)を、シュクロースを炭素源とするMSYE培地および酢酸を炭酸源とするMAYE培地で30℃、16時間培養し、集菌後細胞抽出液を調製した。この細胞抽出液中のICL活性を、実施例1に記載した方法で測定した。結果を表1に示した。コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032 の場合と同様にATCC13032(pKT10)においてもMAYE培地で培養した菌体が高いICL活性を示し、その活性レベルはATCC13032 に比べて約6倍高かった。

【0044】両株の細胞抽出液を用いてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析したところ、MAYE培地で培養した菌体にのみ多量の48kDaのICL蛋白が検出された。コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032(pKT10)の該蛋白質産生量は、全細胞蛋白質の約33%に相当し、ATCC13032 株に比べて5~6倍多かった。以上の結果から、ICL遺伝子は、コピー数を上げたときにも同様に発現調節されることが判明した。

\*

\*【0045】(2)その他の宿主でのICL遺伝子の増幅発現

前記の実施例3(1)と同様な方法で、表1に示すコリネ型細菌10菌種にpKT10を導入した。ただし、プレバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872へのプラスミドpKT10の導入は、特開昭63-185372に記載された方法に従って行った。すなわち、NB培地で培養した本菌の種培養液0.8mlを40ml GIII培地〔グルコース15g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8g、尿素 1.2g、酵母エキス 1.2g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.1g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 2mg、ZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 1mg、MnSO<sub>4</sub>・4~6H<sub>2</sub>O 1mg、ビオチン 0.1mg、サイアミン塩酸塩 2mg、パントテン酸カルシウム 10mg、アデニン 100mg、グアニン 100mgを水1リットルに含みpH7.2に調整した培地〕に接種し、30℃にて振とう培養した。対数増殖期の初期(菌体濃度10<sup>8</sup>個/ml)に0.3単位/mlとなるようにペニシリンGを添加し、さらに3時間培養を続けた。培養液から3,000rpm、10分間の遠心分離により細胞を回収し、GIII培地で洗浄後、P3高張液〔NaCl 70mM、MgCl<sub>2</sub> 5mM、CaCl<sub>2</sub> 5mM、Tris-HCl 25mM、D-ソルビトール1.6M(pH7.6)]に2.0mg/mlリゾチームおよび0.6mg/mlアクロモペプチダーゼを含有する溶液10mlに懸濁し、30℃、16時間静置してプロトプラストを調製した。このようにして調製したプロトプラストを用いて、実施例3(1)に従って形質転換体を得た。

【0046】得られた形質転換体をMSYE培地およびMAYE培地で培養し、その細胞抽出液中のICL活性を測定した。なお、プレバクテリウム・アンモニアゲネスATCC6872およびATCC6872(pKT10)のICL活性は、MSYE培地で培養した菌体および該菌体をMAYE培地に懸濁し、30℃、16時間インキュベートした菌体の細胞抽出液を用いて測定した。表1の結果が示すように、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032(pKT10)の場合と同様に、いずれのpKT10形質転換体についてもMAYE培地で培養あるいはインキュベートした菌体に高レベルのICL活性が検出された。

【0047】

【表1】

表 1

菌	株	ICL比活性(U/mg蛋白)	
		MSYB培地	MAYB培地
コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC13032	ND	760
	ATCC13032(pKT10)	ND	4670
コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム	ATCC13870	ND	980
	ATCC13870(pKT10)	170	6050
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC15991	ND	480
	ATCC15991(pKT10)	ND	4330
コリネバクテリウム・ハーキュリス	ATCC13868	ND	350
	ATCC13868(pKT10)	160	1830
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC15990	ND	300
	ATCC15990(pKT10)	170	2140
プレバクテリウム・イマリオフィラム	ATCC14068	ND	130
	ATCC14068(pKT10)	190	6690
プレバクテリウム・ディバリカツム	ATCC14020	ND	430
	ATCC14020(pKT10)	140	3980
プレバクテリウム・フラブム	ATCC14067	ND	550
	ATCC14067(pKT10)	120	2940
プレバクテリウム・ラクトファーメントム	ATCC13655	ND	230
	ATCC13655(pKT10)	120	2760
マイクロバクテリウム・アンモニアフィラム	ATCC15354	ND	450
	ATCC15354(pKT10)	50	4000
プレバクテリウム・アンモニアゲネス	ATCC6872	ND	ND
	ATCC6872(pKT10)	ND	1730

ND:検出できず

## 【0048】実施例4 ICL遺伝子含有断片の解析

## (1) クローン化DNA断片の制限酵素地図

プラスミドpKT4 DNA 1  $\mu$ gを10~12単位の  
各制限酵素(AflIII、AluI、BglIII、ClaI、HindIII、Hpa  
I、NcoI、NruI、SmaI、SphI、StuI、XhoI) 単独または  
2種類を組み合わせて37℃(SmaI以外の酵素)あるいは  
30℃(SmaI)で1時間反応した。反応液を0.8%ア  
ガロースゲル電気泳動あるいは5%ポリアクリルアミド  
ゲル電気泳動にかけ、生成した切断片のサイズを測定す  
ることにより、クローン化された6.0kbのHindIII DN  
A断片が第1図に示す制限酵素地図からなる構造をもつ  
ことがわかった。

## 【0049】(2) サブクローニング

6.0kb HindIII-DNA断片上にクローン化されたIC 50

L遺伝子の所在を特定するために、いくつかの領域をサ  
ブクローン化した。pKT4プラスミド2  $\mu$ gを含む緩  
衝液C 48  $\mu$ lに10単位のHindIIIとXhoI  
を加えて、37℃で2時間反応させた。一方、pUC1  
9 2  $\mu$ gを含む緩衝液C 18  $\mu$ lに10単位のH  
indIIIとXhoIを加えて、37℃で2時間反応させ  
た。これら両反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動法  
で分離した後、DNA回収精製キットを用いて各々1.9  
kbおよび2.7kbの断片として回収した。両DNA断片  
を、常法のリガーゼ処理により連結した。この反応液を  
E. coli ATCC33694の形質転換に供し、プラスミドpKT  
5を得た。さらに、KpnIで切断したpKT5 DNA  
を、同じ制限酵素で切断したコリネバクテリウム・グル  
タミクムベクタープラスミドpCG116 DNAと連結

し、プラスミドpKT13を作製した。また、pKT4からSmaI-BglII 2.2kb断片、HpaI-BglII 2.1kb断片及びStuI-BglII 1.2kb断片を分取後、各々pCG116のSmaI-BamHIリンカーサイトに挿入連結し、プラスミドpKT19、pKT20、pKT21を作製した。これらのプラスミド上にクローン化されたDNA断片を第3図に示した。

【0050】これらのプラスミドDNAでコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032を形質転換した。形質転換株をMAYE培地で培養し、得られた菌体のICL活性を測定した(第3図)。pKT19保有株とpKT20保有株はpKT10保有株と同レベルの高活性を有していたが、pKT13保有株およびpKT21保有株は宿主とほぼ同レベルの活性しか与えなかった。これらの結果からICL遺伝子は、第3図の上方に矢印で示した2.1kb HpaI-BglIIDNA断片内に位置づけられた。

【0051】(3) ICL遺伝子領域の塩基配列  
ICLをコードするHpaI-BglII 2.1kbDNA断片を、その断片上に存在する制限酵素サイトで切断し、対応する制限酵素で切断したプラスミドpUC118、pUC119(宝酒造社製)に挿入連結した。このようにして調製したプラスミドを用いてメッシングらのM13チェーンターミネーション改良法[メソッド・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 101, 20(1983)]に従って塩基配列を決定した。結果を配列番号3で表されるDNA塩基配列およびICL構造遺伝子に対応するアミノ酸配列で示す。この塩基配列中には、実施例2(1)に示したN末端18アミノ酸残基のうち17アミノ酸のコドンに対応する配列を含む431アミノ酸残基からなるオープンリーディングフレーム(1293bp)が見出された。従って、ICLプロモーター活性はATG上流のDNA配列に特定された。また、ストップコードTAGから27bp下流には、転写終結に機能すると考えられる配列(配列番号3で示されるDNA塩基配列の1833~1846および1850~1863の位置)が存在していた。

【0052】実施例5 コリネ型グルタミン酸生産菌におけるICL遺伝子の相同性

実施例2(1)および(2)に記載したICLのN末端アミノ酸配列に対応する50merオリゴヌクレオチドあるいは5'非翻訳領域であるHpaI-AfII 0.5kb断片(配列番号3)をプローブとして、各種コリネ型グルタミン酸生産菌の染色体DNA断片との相同性をリードらのサザンハイブリダイゼーション法[ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acid. Res.), 13, 7207(1985)]に従って調べた。

【0053】HpaI-AfII 0.5kb断片を調製するために、プラスミドpKT10(第2図、第3図)2μgを含む緩衝液E[10mM Tris-HCl(pH7.5)、40mM KC1、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT]49μlに10単位のAf

IIを添加した後、37℃で1時間反応させ、さらに3μlの1MKClおよび10単位のHpaIを添加し、37℃で1時間反応させた。この反応液を1.2%アガロースゲルに載せ電気泳動後、DNA回収精製キットを用いてHpaI-AfII 0.5kb断片として回収した。50merオリゴヌクレオチドは実施例2(2)に従い5'末端をラベル化し、HpaI-AfII 0.5kb断片はニックトランスレーションキット(宝酒造社製)を用いて[<sup>32</sup>P]でラベル化した。

【0054】コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラムATCC13870、コリネバクテリウム・カルナエATCC15991、コリネバクテリウム・ハーキュリスATCC13868、プレビバクテリウム・ディバリカツムATCC14020、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13655、マイクロバクテリウム・アンモニアフィラムATCC15354から実施例2(3)に記載した方法に従って染色体DNAを調製した。各々の染色体DNA5μgを含む緩衝液B98μlに20単位のHindIIIを添加し、37℃で2時間反応した。これら反応液10μlをそれぞれ0.8%アガロースゲルに載せ電気泳動を行った。泳動後のゲルを0.25M HCl中に浸し15分間振とうした後、脱イオン水ですすぎ、0.4M NaClをしみこませた濾紙(ワットマン3MM)の上に置いた。ゲルの上にナイロンフィルター(BIO-RAD社製 ゼータプローブメンブレン)、濾紙および適当な重しを逐次乗せてゆき、ゲルの下から濾紙越しに0.4M NaOHを供給してDNAをフィルター上に転写した。フィルターを6×SSCで洗浄し、風乾してハイブリダイゼーション実験に供した。このフィルターを、プレハイブリダイゼーション溶液(6×SSC、0.01M EDTA、1%フィコール、1%ポリビニルピロリドン、1%牛血清アルブミン、0.5%SDS、10mg/ml変性サケ精子DNA)20mlに10mg/mlサケ精子変性DNA溶液0.2mlを加えた溶液に浸し、68℃で3時間加熱した。フィルターを、プレハイブリダイゼーション溶液20mlにラベル化した各々のプローブ0.2μgを加えたハイブリダイゼーション溶液に移した。50merオリゴヌクレオチドをプローブとした場合には40℃で16時間、HpaI-AfII 0.5kb断片をプローブとした場合には68℃で16時間ハイブリダイゼーション処理した。処理したフィルターは、SWS(0.3×SSC、0.05%SDS)中に浸し、50merオリゴヌクレオチドをプローブとした場合には52℃、30分間処理を2回行い、HpaI-AfII 0.5kb断片をプローブとした場合には68℃、30分間処理を2回行って洗浄した。各々のフィルターは、風乾した後、X線フィルム(フジフィルム社製)に密着させて感光させた。

【0055】その結果、コリネバクテリウム・カルナエATCC15991以外のコリネ型グルタミン酸生産菌では、いずれのプローブを用いた場合にも約6.0kbの染色体Hi

nd III DNA切断片とハイブリッドを形成した。一方、コリネバクテリウム・カルナエATCC15991において、いずれのプロープを用いた場合にも約2.0kbのHind III 染色体DNA断片とハイブリッドを形成した。これらの結果から、これらグルタミン酸生産菌のICL遺伝子は、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032のICL構造遺伝子領域だけでなく、そのプロモーター領域においても相同性を有することが明らかとなった。

【0056】実施例6 ICLプロモーターによるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ構造遺伝子の発現

大腸菌のプラスミドpKK232-8は、大腸菌由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子領域中、プロモーター配列を除去した翻訳開始に必要な配列から構造遺伝子までの領域を有し、その下流に大腸菌リボソームRNA遺伝子由来のターミネーター配列T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>を配したDNA断片を含んでいる〔Brosius, J. ジーン(Gene), 27, 151(1984)〕。該DNA断片を含みグルタミン酸生産菌で複製できるプラスミドpCGKK27-3を第4図に示すように作製した。

【0057】pKK232-8 DNA (ファルマシア社製) 5 μgを含む緩衝液C 50 μlに0.3単位のPst Iを添加し、37℃で1時間処理した後、68℃で10分間加温して反応を停止した。一方、特開昭57-186489に記載した方法で保有株から調製したグルタミン酸生産菌ベクターpCG11 (特開昭57-134500) DNA 2 μgを12単位のPst Iを添加した緩衝液C 49 μl中で37℃で1時間反応させさらに加温処理した。pKK232-8およびpCG11 DNAの各処理液を0.8%アガロースゲル電気泳動にかけた後、DNA回収精製キットを用いて各々5.1kb および6.8kb DNA断片を回収した。両DNA断片を混合し、T4リガーゼを加えて連結処理した。

【0058】このリガーゼ反応液を用いて、実施例2 (3)に従ってE. coli ATCC33694を形質転換し、スペクチノマイシン25 μg/mlを含むLBプレート上でスペクチノマイシン耐性形質転換体を分離した。形質転換体から抽出したプラスミドDNAを制限酵素で切断解析し、該形質転換体のうちの1つの株から第4図に示すようにpKK232-8とpCG11が連結されたプラスミドpCGKK27-3を取得した。

【0059】さらに、pCGKK27-3 DNAでコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032を実施例3

(1)に記載した方法で形質転換した。スペクチノマイシン耐性で選択された形質転換体は、pCGKK27-3を保有していたが、クロラムフェニコール耐性を示さず、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ構造遺伝子はATCC13032株でも発現しないことを確認し\*

\*た。

【0060】次に、ICLプロモーター活性を含むDNA断片をpCGKK27-3に組み込んだ(第5図参照)。ICLプロモーター含有断片として、第3図に示す0.6kbのSma I-A1u I断片を用いた。pKT19 DNA 5 μgを緩衝液D [10mM Tris-HCl (pH7.5)、20mM KCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT] 49 μl中で10単位のSma Iを添加して30℃、1時間処理した後、0.2M KCl 6 μlおよび10単位のAfl IIを添加し37℃で1時間反応した。反応液を1%アガロースゲルに載せ、電気泳動後DNA回収精製キットを用いて0.8kbのSma I-Afl IIDNA断片を単離した。このDNAを含む緩衝液A [10mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT] 49 μlに10単位のA1u Iを添加して、37℃、1時間反応した後、68℃、10分間加熱処理し、Sma I-A1u IDNA断片含有液を調製した。

【0061】一方、コリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032の形質転換体から単離したpCGKK27-3 DNA 5 μgを、緩衝液D 49 μl中で10単位のSma Iを添加して、30℃、1時間反応させさらに加熱処理した。このpCGKK27-3 DNA含有液と前記のSma I-A1u IDNA断片含有液を混合し、常法によりリガーゼ処理した。処理液を用いてコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032を形質転換し、菌液を酢酸アンモニウム10mg/ml、スペクチノマイシン400 μg/mlおよびクロラムフェニコール5 μg/mlを含有するRCGPプレート上に塗布した。30℃で7日間培養して形質転換体のコロニーを得た。その1株から、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ構造遺伝子含有DNA断片の直前に、Sma I-A1u IDNA断片を組み込んだプラスミドpKT22を取得された(第5図参照)。

【0062】この形質転換株およびATCC13032株をMSYE培地およびMAYE培地で30℃で16時間培養し集菌した。該菌体を破碎し、得られた細胞抽出液中のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ活性を、シャウらの方法〔メソッド・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 43, 737(1975)〕に従って測定した。1分間に1 μmolのクロラムフェニコールのアセチル化を触媒する酵素活性を1単位と定義した。

【0063】上記と同様な方法で、表2に示すコリネ型細菌5菌種にpKT22を各々導入し、得られた形質転換体をMSYE培地およびMAYE培地で培養し、その細胞抽出液中のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ活性を測定した。結果を表2に示す。

【0064】

【表2】

表 2

菌 株		クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ 比活性(U/mg蛋白)	
		MSYE培地	MAYE培地
コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC13032	0	0
	ATCC13032(pKT22)	0.6	27.4
コリネバクテリウム・ハーキュリス	ATCC13868	0	0
	ATCC13868(pKT22)	0.2	13.2
プレバクテリウム・デバリカツム	ATCC14020	0	0
	ATCC14020(pKT22)	0.5	25.8
プレバクテリウム・ラクトファーマンタム	ATCC13655	0	0
	ATCC13655(pKT22)	0.3	22.0
プレバクテリウム・アンモニアゲネス	ATCC6872	0	0
	ATCC6872 (pKT22)	0.1	12.6

【0065】表2に示したように形質転換株は、MAYE培地で培養した時、高レベルのクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼを産生していることが認められた。著量のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動解析において24kDaの蛋白バンドとして観察された。以上の結果から、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ構造遺伝子はICLプロモーターにより誘導的に発現していることが確認された。

【0066】実施例7 ICLプロモーターによるβ-ガラクトシダーゼ構造遺伝子の発現

ICLプロモーターにより大腸菌のβ-ガラクトシダーゼ構造遺伝子を発現する発現ベクターの作製を試みた。第6図に工程の概略を示した。

【0067】ICL遺伝子を含むプラスミドpKT20 10μgを含む緩衝液C 98μlに24単位のStu Iを添加し、37℃で2時間反応後、等量のフェノールで1回抽出した。さらに、等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24/1, v/v)で1回抽出し、エタノール沈澱後真空乾燥した。このDNAをキロシークエンスディレクションキット (宝酒造社製) を用いてエキソヌクレアーゼIIIによる欠失処理をした。これら欠失断片を含む緩衝液C 48μlに20単位のXho Iを添加し、37℃で2時間反応させた。

【0068】一方、β-ガラクトシダーゼ構造遺伝子含有DNA断片をプラスミドpE' lac1 (特開昭63-273469)から調製した。該プラスミドは、大腸菌ラクトースオペロン中β-ガラクトシダーゼ構造遺伝子のN末端から8番目のアミノ酸のコードンから上流の配列が欠如したDNA配列を含んでいる。pE' lac1 DNA 5μgを含む緩衝液D 49μlに10単位のSma Iを添加し、30℃で2時間反応させた。さらに1.5μlの

5M NaClと10単位のSma Iを添加し、37℃で2時間反応させた。プラスミドpKT20およびpE' lac1の切断片を各々0.8%アガロースゲル電気泳動で分離した後、DNA回収精製キットを用いて各々約7.6kbおよび6.2kbの断片として回収した。両者を常法のリガーゼ処理により連結した。

【0069】このリガーゼ処理液を用いてコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032を実施例3(1)の方法に従って形質転換した後、菌液をスペクチノマイシン 400μg/ml、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド (X-gal) 40μg/ml及び酢酸アンモニウム0.01g/mlを含有するRCGPプレート上に塗布した。30℃、7日間培養後、このプレート上で青く染まった形質転換体を得られた。該形質転換体のうちの1つは、6.2kbのラクトースオペロン由来DNA断片がICL遺伝子含有DNA断片内に挿入されたプラスミドpKT23を保有していた (第6図参照)。

【0070】この形質転換体とコリネバクテリウム・グルタミクムATCC13032をMSYE培地およびMAYE培地に於て30℃で16時間培養し集菌した。菌体を破碎し、細胞抽出液のβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。β-ガラクトシダーゼ活性の測定は、ミラーらの方法 [Experiments in Molecular Genetics, 352、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) (1972)] に従って行った。1分間に1μmolのO-ニトロフェノールの生成を触媒する酵素活性を1単位とし、蛋白質1mg当りの比活性を算出した。

【0071】上記と同様な方法で、表3に示すコリネ細菌4菌種にpKT23を各々導入し、得られた形質転

20

30

40

50



換体をMSYE培地およびMAYE培地で培養し、その細胞抽出液中の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。結果を表3に示す。

\*【0072】

【表3】

\*  
表 3

菌 株	$\beta$ -ガラクトシダーゼ 比活性(U/mg蛋白)	
	MSYE培地	MAYE培地
コリネバクテリウム・グルタミカム	0	0
	ATCC13032(pKT23)	700 30900
コリネバクテリウム・ハーキュリス	0	0
	ATCC13868(pKT23)	300 14400
ブレバクテリウム・デバリカツム	0	0
	ATCC14020(pKT23)	500 27500
ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム	0	0
	ATCC13655(pKT23)	350 22700

【0073】その結果、形質転換体のみが、MAYE培地で培養したときに高レベルの $\beta$ -ガラクトシダーゼを産生していた。著量の $\beta$ -ガラクトシダーゼが、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動解析において116 kDaより少し大きい蛋白バンドとして検出された。さらに、pKT23上でのICL遺伝子領域の5'側のDNA断片と $\beta$ -ガラクトシダーゼ構造遺伝子の結合位置を調べた。pKT23 DNA 2 $\mu$ gおよびプラスミドpUC118 DNA (宝酒造社製) 2 $\mu$ gをそれぞれを含む緩衝液A49 $\mu$ lに、それぞれ10単位のKpnIを添加し、37℃で2時間反応させた。さらに、0.5 $\mu$ lの5M NaClと10単位のBamHIを加えて滅菌水で反応液量を55 $\mu$ lに調整し、37℃で2時間反応させた。これらpKT23およびpUC118切断片処理物を、各々0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、各々約0.7 kbおよび7.2 kbの断片をDNA回収精製キットを用いて回収した。両者を常法のリガーゼ処理により連結した後、実施例4(3)に従って塩基配列を決定した。 ※

※【0074】その結果、配列番号4で示されるイソクエン酸リアーゼのN末端から63番目までのアミノ酸をコードするDNA断片にN末端8アミノ酸を欠く $\beta$ -ガラクトシダーゼ構造遺伝子がインフレームで連結されていることがわかった。以上の結果から、ICLプロモーターの支配下に $\beta$ -ガラクトシダーゼ融合蛋白が誘導的に合成されることがわかった。

【0075】

【発明の効果】本発明によれば、コリネ型細菌において有用遺伝子産物を効率よく生産させるための遺伝子発現調節DNAを提供することができる。

【0076】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：18

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

配列

Ser Asn Val Gly Lys Pro Arg Thr Ala Gln Glu Ile Gln Gln Asp Asp

1

5

10

15

Asp Thr

【0077】配列番号：2

配列の長さ：50

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★配列の種類：他の核酸 合成DNA

ハイボセティカル配列：Yes

アンチセンス：Yes

フラグメント型：N末端フラグメント

★

配列

GTATCATCAT CCTGCTGGAT TTCCTGGGCG GTCCGTGGCT TGCCAACGTT 50

【0078】配列番号：3

50 配列の長さ：2135

27

28

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム グルタミクム (Corynebacterium)

\* terium glutamicum)

株名：ATCC 13032

配列の特徴

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：514..1806

特徴を決定した方法：E

配列

```

GTTAACGGTT GTGAAACTC TTTTAAGAAA AGCACTCTGA CTACCTCTGG AATCTAGGTG 60
CCACTCTTCT TTCGATTTC ACCCTTATCG TGTTTGGCGA TGTGATCAGA CTAAGTGATC 120
ACCGTCACCA GCAAAAGGGG TTTGCGAACT TTACTAAGTC ATTACCCCGG CCTAACCCCG 180
ACTTTTATCT AGGTCACACC TTCGAAACCT ACGGAACGTT GCGGTGCCTG CATTTTCCCA 240
TTTCAGAGCA TTGCCCAGT ACATCCGTAC TAGCAACTCC CCCGCCACT TTTTCTGCGA 300
AGCCAGAACT TTGCAAACTT CACAACAGGG GTGACCACCC GCACAAAACCT TAAAAACCCA 360
AACCAGATTGA CGCAACAATG CCCGATGGAG CAATGTGTGA ACCACGCCAC CACGCAAAAC 420
GATGCACATT ACGTCGAAAC AGTGACAGTG CATTAGCTCA TACTTTGTGG TGGCACC GCC 480
CATTGCGAAT CAGCACTTAA GGAAGTGACT TTG ATG TCA AAC GTT GGA AAG CCA 534
Met Ser Asn Val Gly Lys Pro
1 5
CGT ACC GCA CAG GAA ATC CAG CAG GAT TGG GAC ACC AAC CCT CGT TGG 582
Arg Thr Ala Gln Glu Ile Gln Gln Asp Trp Asp Thr Asn Pro Arg Trp
10 15 20
AAC GGC ATC ACC CGC GAC TAC ACC GCA GAC CAG GTA GCT GAT CTG CAG 630
Asn Gly Ile Thr Arg Asp Tyr Thr Ala Asp Gln Val Ala Asp Leu Gln
25 30 35
GGT TCC GTC ATC GAG GAG CAC ACT CTT GCT GCC GCG GCT CAG AGA TCC 678
Gly Ser Val Ile Glu Glu His Thr Leu Ala Ala Ala Gln Arg Ser
40 45 50 55
TCT GGG ACG CAG TCA CCC AGG AAG GTG ACG GAT ACA TCA ACG CTT GGC 726
Ser Gly Thr Gln Ser Pro Arg Lys Val Thr Asp Thr Ser Thr Leu Gly
60 65 70
GCA CTC ACC GGT AAC CAG GCT GTT CAG CAG GTT CGT GCA GGC CTG AAG 774
Ala Leu Thr Gly Asn Gln Ala Val Gln Gln Val Arg Ala Gly Leu Lys
75 80 85
GCT GTC TAC CTG TCC GGT TGG CAG GTC GCA GGT GAC GCC AAC CTC TCC 822
Ala Val Tyr Leu Ser Gly Trp Gln Val Ala Gly Asp Ala Asn Leu Ser
90 95 100
GGC CAC ACC TAC CCT GAC CAG TCC CTC TAC CCA GCG AAC TCC GTT CCA 870
Gly His Thr Tyr Pro Asp Gln Ser Leu Tyr Pro Ala Asn Ser Val Pro
105 110 115
AGC GTC GTT CGT CGC ATC AAC AAC GCA CTG CTG CGT TCC GAT GAA ATC 918
Ser Val Val Arg Arg Ile Asn Asn Ala Leu Leu Arg Ser Asp Glu Ile
120 125 130 135
GCA CGC ACC GAA GCG ACA CCT CCG TTG ACA ACT GGG TTG TCC CAA TCG 966
Ala Arg Thr Glu Ala Thr Pro Pro Leu Thr Thr Gly Leu Ser Gln Ser
140 145 150
TCG CGG ACG GCG AAG TGG CTT CGG TGG AGC ACT CAA CGT CTA CAA CTC 1014
Ser Arg Thr Ala Lys Trp Leu Arg Trp Ser Thr Gln Arg Leu Gln Leu
155 160 165
CAG AAG GCA ATG ATC GCA GCT GGC GCT GCA GGC ACC CAC TGG GAA GAC 1062
Gln Lys Ala Met Ile Ala Ala Gly Ala Gly Thr His Trp Glu Asp

```

29 30  
 170 175 180  
 CAC GTC GCT TCT GAA AAG AAG TGT GGC CAC CTC GGC GGC AAG GTT CTG 1110  
 His Val Ala Ser Glu Lys Lys Cys Gly His Leu Gly Gly Lys Val Leu  
 185 190 195  
 ATC CCA ACC CAG CAG CAC ATC CGC ACC CTG AAC TCT GCC CGC CTT GCA 1158  
 Ile Pro Thr Gln Gln His Ile Arg Thr Leu Asn Ser Ala Arg Leu Ala  
 200 205 210 215  
 GCA GAC GTT GCA AAC ACC CCA ACT GTT GTT ATC GCA CGT ACC GAC GCT 1206  
 Ala Asp Val Ala Asn Thr Pro Thr Val Val Ile Ala Arg Thr Asp Ala  
 220 225 230  
 GAG GCA GCA ACC CTG ATC ACC TCT GAC GTT GAT GAG CGC GAC CAA CCA 1254  
 Glu Ala Ala Thr Leu Ile Thr Ser Asp Val Asp Glu Arg Asp Gln Pro  
 235 240 245  
 TTC ATC ACC GGT GAG CGC ACC GCA GAA GGC TAC TAC CAC GTC AAG AAT 1302  
 Phe Ile Thr Gly Glu Arg Thr Ala Glu Gly Tyr Tyr His Val Lys Asn  
 250 255 260  
 GGT CTC GAG CCA TGT ATC GCA CGT GCA AAG TCC TAC GCA CCA TAC GCA 1350  
 Gly Leu Glu Pro Cys Ile Ala Arg Ala Lys Ser Tyr Ala Pro Tyr Ala  
 265 270 275  
 GAT ATG ATC TGG ATG GAG ACC GGC ACC CCT GAC CTG GAG CTC GCT AAG 1398  
 Asp Met Ile Trp Met Glu Thr Gly Thr Pro Asp Leu Glu Leu Ala Lys  
 280 285 290 295  
 AAG TTC GCT GAA GGC GTT CGC TCT GAG TTC CCA GAC CAG CTG CTG TCC 1446  
 Lys Phe Ala Glu Gly Val Arg Ser Glu Phe Pro Asp Gln Leu Leu Ser  
 300 305 310  
 TAC AAC TGC TCC CCA TCC TTC AAC TGG TCT GCA CAC CTC GAG GCA GAT 1494  
 Tyr Asn Cys Ser Pro Ser Phe Asn Trp Ser Ala His Leu Glu Ala Asp  
 315 320 325  
 GAG ATC GCT AAG TTC CAG AAG GAA CTC GGC GCA ATG GGC TTC AAG TTC 1542  
 Glu Ile Ala Lys Phe Gln Lys Glu Leu Gly Ala Met Gly Phe Lys Phe  
 330 335 340  
 CAG TTC ATC ACC CTC GCA GGC TTC CAC TCC CTC AAC TAC GGC ATG TTC 1590  
 Gln Phe Ile Thr Leu Ala Gly Phe His Ser Leu Asn Tyr Gly Met Phe  
 345 350 355  
 GAC CTG GCT TAC GGA TAC GCT CGC GAA GGC ATG ACC TCC TTC GTT GAC 1638  
 Asp Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Arg Glu Gly Met Thr Ser Phe Val Asp  
 360 365 370 375  
 CTG CAG AAC CGT GAG TTC AAG GCA GCT GAA GAG CGT GGC TTC ACC GCT 1686  
 Leu Gln Asn Arg Glu Phe Lys Ala Ala Glu Glu Arg Gly Phe Thr Ala  
 380 385 390  
 GTT AAG CAC CAG CGT GAG GTT GGC GCA GGC TAC TTC GAC CAG ATC GCA 1734  
 Val Lys His Gln Arg Glu Val Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Gln Ile Ala  
 395 400 405  
 ACC ACC GTT GAC CCG AAC TCT TCT ACC ACC GCT TTG AAG GGT TCC ACT 1782  
 Thr Thr Val Asp Pro Asn Ser Ser Thr Thr Ala Leu Lys Gly Ser Thr  
 410 415 420  
 GAA GAA GGC CAG TTC CAC AAC TAG GACCTACAGG TTCTGACAAT TTAAATCTCC 1836  
 Glu Glu Gly Gln Phe His Asn \*\*\*  
 425 430  
 CTACATCTGT ACAACGGATG TAGGGAGTTT TDCCTTATAT ATGCCCTCCA CAAATCCCCT 1896

31

32

ATCGTGTGAG ATGTGTTTCA TAGGTGCCCC CAACGTTGCC TGTGACTGC AAATTTTCCG 1956  
 AAAGAATCCA TAAACTACTT CTTTAAGTCG CCAGATTAAA GTCGTCAATG AAAGGACATA 2016  
 CATGTCTATT TCCCGCACCG TCTTCGGCAT CGCAGCCACC GCAGCCCTGT CTGCAGCTCT 2076  
 CGTTGCGTGT TCTCCACCTC ACCAGCAGGA TTCCCCAGTC CAGCGCACCA ATGAGATCT 2135

【0079】配列番号：4

配列の長さ：702

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

フラグメント型：N末端フラグメント

起源

\* 生物名：コリネバクテリウム グルタミカム (Coryneba  
 cterium glutamicum)

株名：ATCC 13032

配列の特徴

特徴を表す記号：transit peptide

10 存在位置：514..702

特徴を決定した方法：E

\*

配列

GTAAACGGTT GTGAAAATC TTTAAGAAA AGCACTCTGA CTACCTCTGG AATCTAGGTG 60  
 CCACTCTTCT TTCGATTCA ACCCTTATCG TGTGTTGCGA TGTGATCAGA CTAAGTGATC 120  
 ACCGTCACCA GCAAAAGGGG TTTGCGAACT TTACTAAGTC ATTACCCCGG CCTAACCCCG 180  
 ACTTTTATCT AGGTCACACC TTCGAAACCT ACGGAACGTT GCGGTGCCTG CATTTTCCCA 240  
 TTTCAGAGCA TTTGCCCAGT ACATCCGTAC TAGCAACTCC CCGGCCACT TTTTCTGCGA 300  
 AGCCAGAACT TTGCAAACTT CACAACAGGG GTGACCACCC GCACAAAACCT TAAAAACCCA 360  
 AACCGATTGA CGCACCAATG CCGGATGGAG CAATGTGTGA ACCACGCCAC CACGCAAAAC 420  
 GATGCACATT ACGTCGAAAC AGTGACAGTG CATTAGCTCA TACTTTGTGG TGGCACC GCC 480  
 CATTGCGAAT CAGCACTTAA GGAAGTGACT TTG ATG TCA AAC GTT GGA AAG CCA 534

Met Ser Asn Val Gly Lys Pro

1

5

CGT ACC GCA CAG GAA ATC CAG CAG GAT TGG GAC ACC AAC CCT CGT TGG 582  
 Arg Thr Ala Gln Glu Ile Gln Gln Asp Trp Asp Thr Asn Pro Arg Trp

10

15

20

AAC GGC ATC ACC CGC GAC TAC ACC GCA GAC CAG GTA GCT GAT CTG CAG 630  
 Asn Gly Ile Thr Arg Asp Tyr Thr Ala Asp Gln Val Ala Asp Leu Gln

25

30

35

GGT TCC GTC ATC GAG GAG CAC ACT CTT GCT GCC GCG GCT CAG AGA TCC 678  
 Gly Ser Val Ile Glu Glu His Thr Leu Ala Ala Ala Gln Arg Ser

40

45

50

55

TCT GGG ACG CAG TCA CCC AGG AAG 702

Ser Gly Thr Gln Ser Pro Arg Lys

60

【0080】

【図面の簡単な説明】

【図1】第1図はICL遺伝子のHindIII 6.0kbク  
 ローン化DNA断片の制限酵素地図を示す。

【図2】第2図はpKT10の作製工程を示す。

【図3】第3図はICL遺伝子のHindIII 6.0kb ク※

※ローン化DNA断片のサブクローニングにおける制限酵  
 素地図を示す。

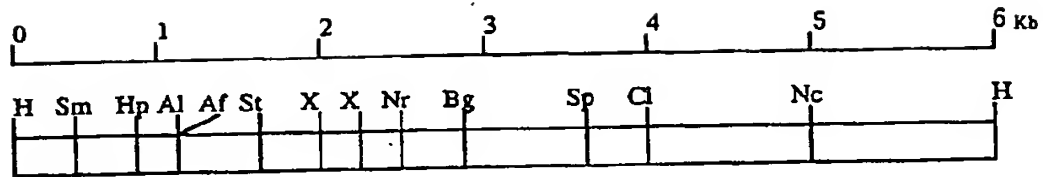
【図4】第4図はpCGKK27-3の作製工程を示  
 す。

【図5】第5図はpKT22の作製工程を示す。

【図6】第6図はpKT23の作製工程を示す。

【図1】

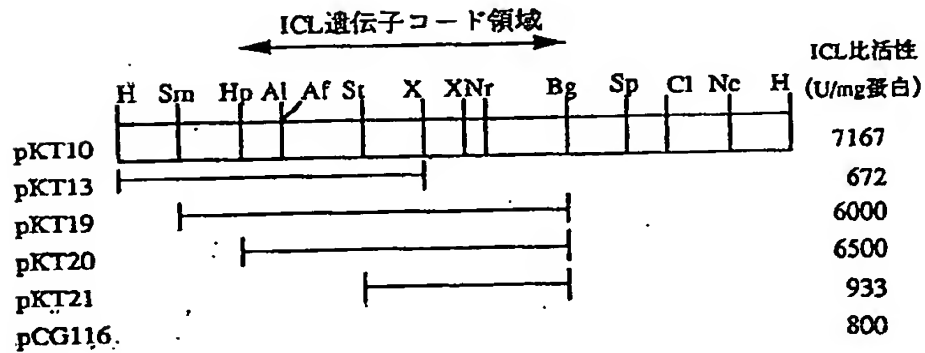
第1図



Al.AluI, Af.AflIII, Bg.BglII, Cl.ClaI, H.HindIII, Hp.HpaI, Nc.NcoI, Nr.NruI, Sm.SmaI, Sp.SphI, St.StuI, X.XhoI

【図3】

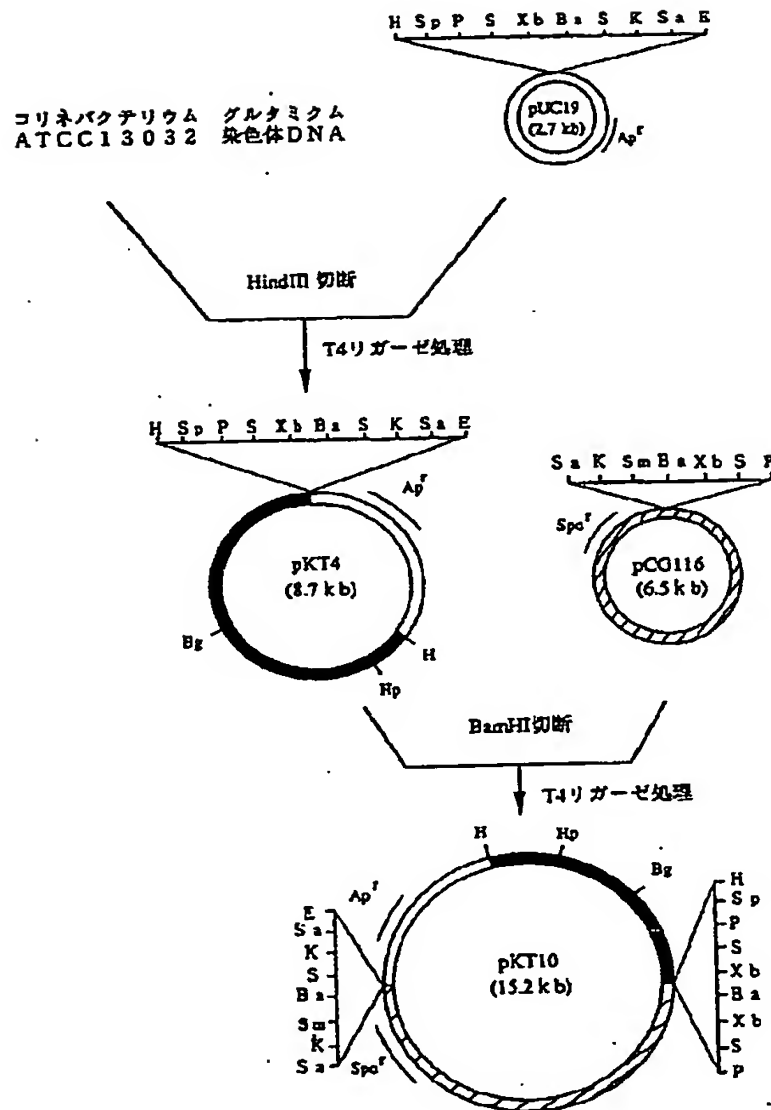
第3図



Al.AluI, Af.AflIII, Bg.BglII, Cl.ClaI, H.HindIII, Hp.HpaI, Nc.NcoI, Nr.NruI, Sm.SmaI, Sp.SphI, St.StuI, X.XhoI

【図2】

第2図

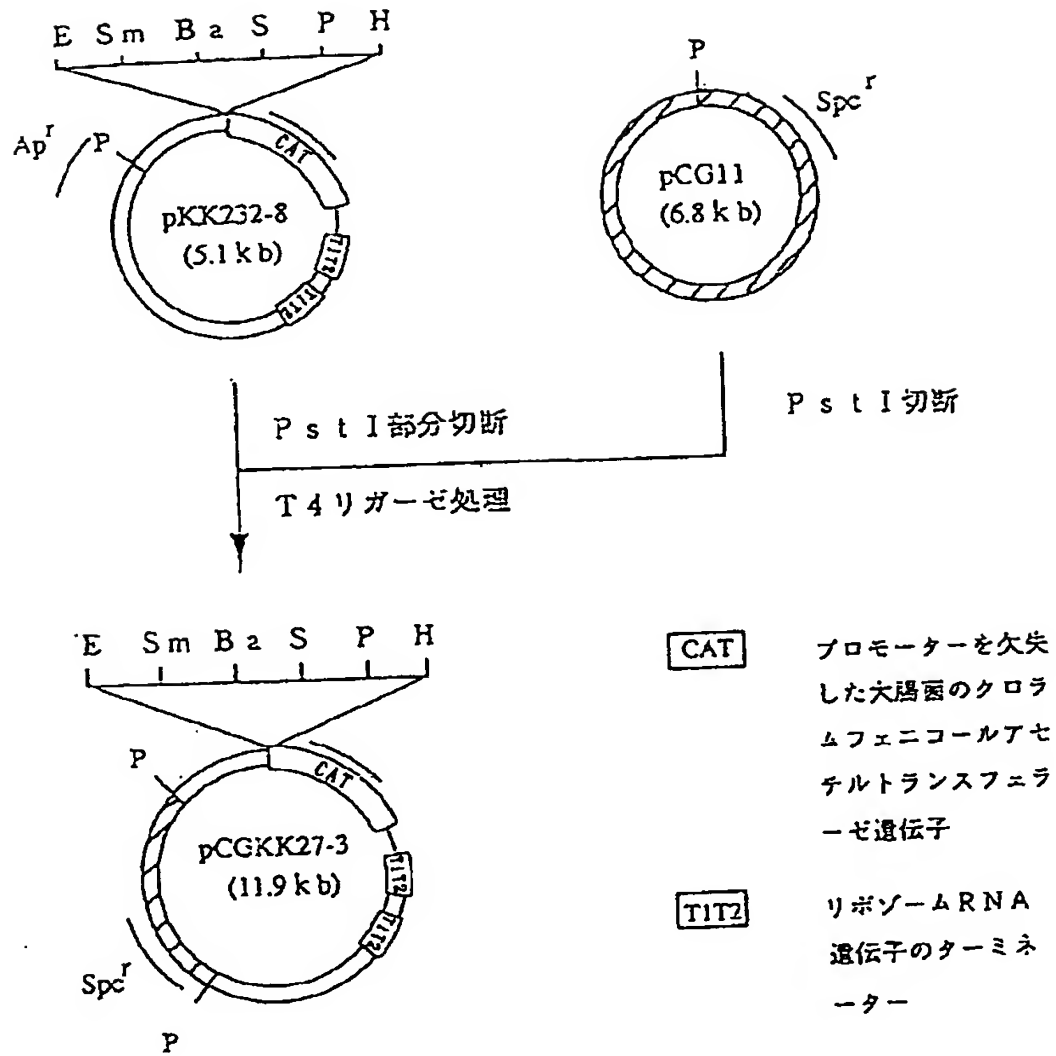


Ba.BamHI, Bg.BglII, E.EcoRI, H.HindIII, Hp.HpaI, K.KpnI, S.SalI,  
 Sa. Sac I, Sm.SmaI, Sp.SphI, P.PstI, Xb.XbaI  
 ■ コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032 染色体  
 DNA断片 (6.0kbHindIII断片)



【図4】

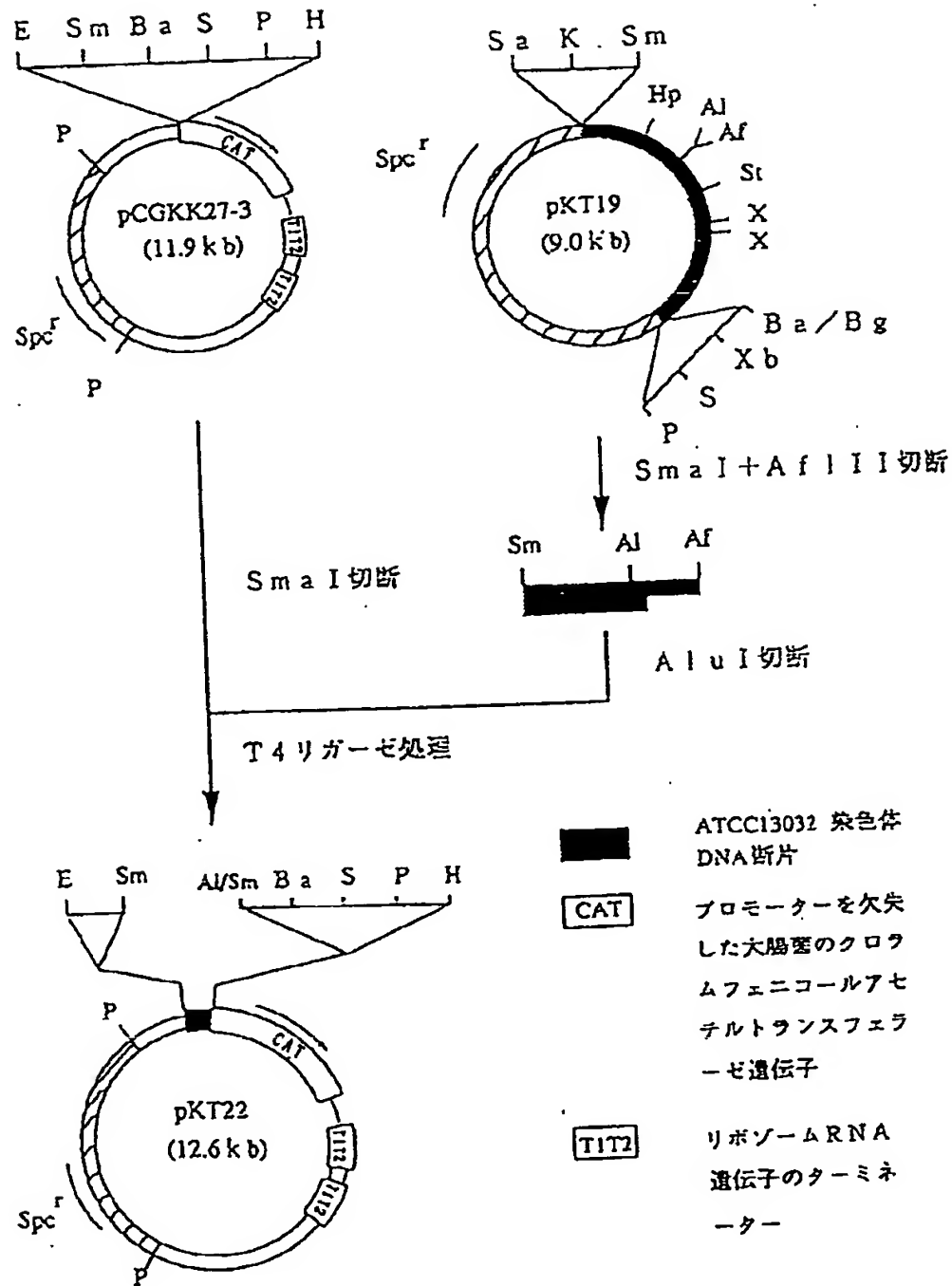
第4図



Ba. BamHI, E. EcoRI, H. HindIII, S. SalI, Sm. SmaI, P. PstI

【図5】

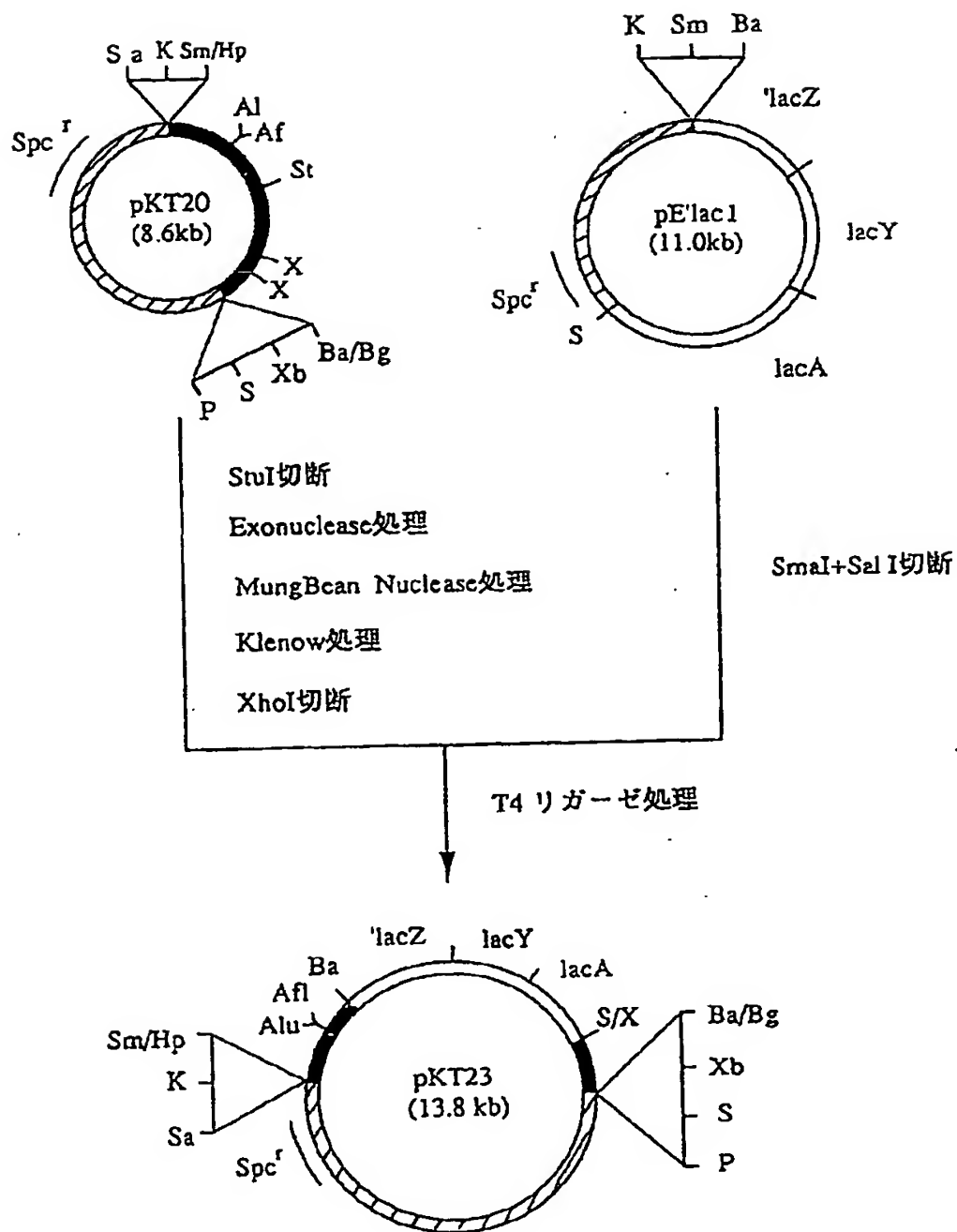
第5図



Al. *Afl*III, *Afl*III, *Ba*. *Bam*HI, *Bg*. *Bgl*III, *E*. *Eco*RI, *H*. *Hind*III, *Hp*. *Hpa*I  
*K*. *Kpn*I, *S*. *Sal*I, *Sm*. *Sma*I, *St*. *Stu*I, *P*. *Pst*I, *X*. *Xba*I, *Xb*. *Xba*I

【図6】

第6図



Al.AluI, Af.AflII, Ba.BamHI, Bg.BglII, E.EcoRI, Hp.HpaI, K.KpnI, P.PstI,  
S.SalI, Sm.SmaI, St.StuI, X.XhoI, Xb.XbaI

■ ATCC13032 染色体 DNA 断片

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

C 1 2 N 9/88

15/17

15/20

15/27

15/54

15/56

15/58

15/60

15/67

15/77

C 1 2 P 21/02

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

7823-4B

E 8214-4B

H 8214-4B

F 8214-4B

C 8214-4B

// (C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 N 9/10

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 N 9/10

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 9/10

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 N 9/38

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 N 9/38

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 9/38

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 N 9/88

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 N 9/88

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 9/88

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:01)